

Skin equivalent comprising langerhans' cells

Patent Number: US5861153

Publication date: 1999-01-19

Inventor(s): SCHMIDT RAINER (FR); SCHMITT DANIEL (FR); REGNIER MARCELLE (FR); STAQUET MARIE-JEANNE (FR)

Applicant(s): SOCIETEL OREAL S A (FR)

Requested Patent: EP0789074

Application Number: US19970785287 19970123

Priority Number (s): FR19960000743 19960123

IPC Classification: C12N5/08 ; C12N5/06

EC Classification: A61L27/60, C12N5/06B12A2

Equivalents: CA2195795, FR2743817, JP3021379B2, JP9201410

Abstract

The present invention relates to a reconstructed skin model, characterized in that it comprises an epidermis equivalent on a support, the said epidermis equivalent comprising at least keratinocytes and at least induced or noninduced precursors of Langerhans' cells, as well as the process for preparing the said skin equivalent. The invention also relates to an epidermis equivalent, characterized in that it comprises at least keratinocytes and at least induced or noninduced precursors of Langerhans' cells and to the process for preparing it.

Data supplied from the **esp@cenet** database - I2



(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11)

EP 0 789 074 A1

(12)

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(43) Date de publication
13.08.1997 Bulletin 1997/33

(51) Int Cl 6 C12N 5/06, A61L 27/00

(21) Numéro de dépôt 97400037.4

(22) Date de dépôt 08.01.1997

(84) Etats contractants désignés
AT BE DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT
SE

(30) Priorité 23.01.1996 FR 9600743

(71) Demandeur L'OREAL
75008 Paris (FR)

(72) Inventeurs
• Schmidt, Rainer
75018 Paris (FR)

- Schmitt, Daniel
38540 Heyrieux (FR)
- Regnier, Marcelle
75018 Paris (FR)
- Staquet, Marie-Jeanne
69150 Decines (FR)

(74) Mandataire Tezier Herman, Béatrice
L'OREAL,
Département Propriété Industrielle
90, rue du Gal Roguet
92583 Clichy Cédex (FR)

(54) Equivalent de peau comprenant des cellules de Langerhans

(57) La présente invention concerne un modèle de peau reconstruite, caractérisé par le fait qu'il comprend un équivalent d'épiderme sur un support, ledit équivalent d'épiderme comprenant au moins des kératinocytes et au moins des précurseurs de cellules de Langerhans induits ou non, ainsi que le procédé de préparation àudit

équivalent de peau.

L'invention concerne également un équivalent d'épiderme, caractérisé par le fait qu'il comprend au moins des kératinocytes et au moins des précurseurs de cellules de Langerhans induits ou non et son procédé de préparation.

EP 0 789 074 A1

Description

La présente invention concerne un nouvel équivalent de peau. Son procédé d'obtention, l'équivalent d'épiderme compris dans cet équivalent de peau et son procédé de préparation.

On cherche à mettre au point depuis plusieurs années des modèles de peau reconstruite qui permettent d'effectuer les études nécessaires à la meilleure compréhension du rôle de la peau tant dans le domaine mécanique que dans le domaine physiologique.

Ainsi, des modèles plus ou moins proches de la peau humaine ont pu être mis au point. On peut citer par exemple les modèles décrits dans les brevets ou dans les demandes de brevets EP 285471, EP 285474, EP 418035, WO-A-90 02796, WO-A-9116010, EP 197090, EP 20753, FR 2665175, FR 2689904.

De manière très générale, les modèles de peau reconstruite décrits dans ces documents sont constitués de kératinocytes humains déposés sur un support, souvent un équivalent de derme, et cultivés dans des conditions telles qu'ils entrent dans un programme de différenciation aboutissant à la formation d'un équivalent d'épiderme.

Cependant, l'épiderme humain naturel est composé principalement de trois types de cellules qui sont les kératinocytes très majoritaires, les mélanocytes et les cellules de Langerhans. Chacun de ces types cellulaires contribue par ses fonctions propres au rôle essentiel joué dans l'organisme par la peau.

Les cellules de Langerhans sont impliquées dans les défenses immunitaires de la peau. On sait depuis longtemps que celles-ci occupent une place essentielle dans les défenses immunitaires de l'hôte, en particulier comme première barrière face aux agressions extérieures.

Les cellules de Langerhans sont des cellules dérivées de la moelle osseuse qui peuvent être caractérisées par la présence de granules de Birbeck et l'expression du marqueur antigénique CD1a (cellules CD1a positives) (Rowden et coll., Nature 268 : 247-248, 1977). Elles jouent un rôle décisif dans l'initiation des réponses immunitaires dirigées contre les antigènes introduits dans la peau ou nouvellement générés par celle-ci. Mises en contact avec un allergène, les cellules de Langerhans migrent vers les ganglions où elles déclenchent les réactions spécifiques des cellules-T. À ce titre, elles sont donc assimilées aux cellules de présentation des antigènes, essentielles au bon fonctionnement des lymphocytes T.

Ainsi, la principale fonction des cellules de Langerhans est de fournir un signal sensitif dans la réponse immunitaire de la peau induite contre une grande variété d'antigènes incluant les allergènes de contact, les antigènes tumoraux et les microorganismes.

On peut donc en conclure que ces cellules interviennent probablement dans un grand nombre de pathologies de la peau.

Le document WO-A-90 02796 suggère d'ajouter dans un système tridimensionnel de culture de peau des cultures de kératinocytes et de mélanocytes, des cellules de Langerhans isolées à partir de prélèvements de peau fraîche. Ce même document précise que la croissance en culture de telles cellules est difficile. Il s'avère en fait que les cellules de Langerhans purifiées à partir de prélèvement de peau sont des cellules issues de précurseurs qui ont progressé dans leur cycle de différenciation jusqu'à devenir ces cellules CD1a positives et que ces cellules isolées ne progressent plus dans leur cycle de différenciation.

La culture *in vitro* de telles cellules se résume à un maintien en survie du fait de l'incapacité pour ces cellules de se multiplier. En fait, ces cellules s'arrêtent et meurent sans avoir rempli leur rôle. Il en est de même lorsque ces cellules sont introduites dans un modèle de peau reconstruite. Ainsi, même s'il est suggéré d'introduire des cellules de Langerhans dans ce document, la peau reconstruite obtenue ne pourrait être satisfaisante dans la mesure où les cellules de Langerhans ne survivent pas.

Les mélanocytes sont localisés dans la couche basale de l'épiderme. Ils sont le siège de la mélanogénèse et du fait de leur contact étroit avec les kératinocytes ils transfèrent à ceux-ci la mélanine néosynthétisée sous la forme de mélanosomes, donnant ainsi à la peau sa coloration. Le type et la quantité de mélanine contenue dans les mélanosomes détermine la coloration de la peau. De plus, la mélanine constitue principalement un écran efficace pour la protection contre les rayonnements solaires en particulier les rayonnements ultraviolets. Un modèle de peau reconstruite ayant incorporé des mélanocytes est décrit dans la demande de brevet WO-A-9351165.

On comprend donc que les modèles de peau reconstruite décrits dans l'art antérieur ne permettent que des études incomplètes du rôle et/ou des réactions de la peau. En effet, l'absence de cellules de Langerhans, cellules essentielles pour les défenses immunitaires de la peau, dans ces modèles rend ceux-ci inutilisables pour des études immunologiques *in vitro*. Par ailleurs, on peut supposer que les études pharmacologiques et/ou toxicologiques réalisées avec ces modèles n'ont pu refléter qu'une partie de la réalité des interactions du fait de l'absence de ce composant essentiel de la peau que constituent les cellules de Langerhans.

Indépendamment des phénomènes naturels qui conduisent aux symptômes liés aux peaux dites sensibles et/ou allergiques, phénomènes qu'un tel modèle pourra permettre de mieux cerner, l'industrie en général, et celle des cosmétiques en particulier, introduit de plus en plus souvent des composés nouveaux dans ses compositions. Un des problèmes majeurs auquel elle est confrontée est alors l'évaluation des effets néfastes que ces composés pourraient induire au contact de la peau en particulier en terme de sensibilisation de contact.

Pour des raisons d'éthique il est évident que cette évaluation ne peut être pratiquée ni sur l'homme ni sur les animaux

On comprend alors l'intérêt d'un modèle *in vitro* qui puisse permettre par l'apprehension des mécanismes de défense de la peau une meilleure compréhension des symptômes liés aux peaux dites sensibles et/ou allergiques et une évaluation des effets néfastes des composés potentiellement utilisables dans l'industrie

La demanderesse, qui depuis de longues années s'intéresse au domaine des peaux reconstruites, a maintenant découvert qu'il est possible d'incorporer au moins des précurseurs de cellules de Langerhans préalablement induits ou non, dans un modèle de peau reconstruite

La présente invention a donc pour objet un modèle de peau reconstruite caractérisé par le fait qu'il comprend un équivalent d'épiderme sur un support, l'édit équivalent d'épiderme comprenant au moins des kératinocytes et au moins des précurseurs de cellules de Langerhans induits ou non

L'expression "précurseurs de cellules de Langerhans induits" couvre dans ce texte toute cellule normale ou pathologique qui a subi préalablement sa mise en co-culture au moins un traitement destiné à lui conférer les caractères d'une cellule de Langerhans, c'est à dire une cellule CD1a positive sans préjuger de l'acquisition ou non par cette cellule du caractère CD1a positif

Dans la peau normale les cellules de Langerhans sont localisées dans la partie suprabasale de l'épiderme

Préférentiellement, le modèle de peau reconstruite selon l'invention présente au moins des précurseurs de cellules de Langerhans induits ou non localisés dans la partie suprabasale de l'équivalent d'épiderme.

Il est bien entendu que l'équivalent de peau de l'invention peut comprendre tout autre type cellulaire qui pourrait y être incorporé

La demanderesse a réussi à établir un procédé de préparation d'un équivalent de peau comprenant un équivalent d'épiderme sur un support, l'édit équivalent d'épiderme comprenant au moins des kératinocytes et au moins des précurseurs de cellules de Langerhans induits ou non

L'invention a également pour objet un procédé pour la préparation d'un équivalent de peau tel que décrit ci-dessus caractérisé par le fait que l'on co-cultive sur le support des kératinocytes et au moins des précurseurs de cellules de Langerhans induits ou non

Pour faciliter la compréhension, l'emploi du terme "co-culture" (ou des termes apparentés) doit s'entendre comme se rapportant aux cultures cellulaires effectuées sur le support permettant l'élaboration de la peau reconstruite sans que cela sous-entende obligatoirement la présence de plus d'une espèce cellulaire. Les termes "culture" et "cultive" s'entendent alors comme se rapportant aux cultures cellulaires effectuées de manière

classique par exemple dans des boîtes de cultures cellulaires traditionnelles

Le support utilisé selon l'invention peut être l'un quelconque de ceux décrits dans l'art antérieur. A titre d'exemple, on peut citer comme support les lattices mixtes collagène/fibroblastes, le derme préalablement désépidermisé, les membranes artificielles comme par exemple les filtres de marque Millipores, les substituts sous-cutanés à base de collagène, le plastique ou tout autre support compatible avec la viabilité cellulaire

Préférentiellement, le support est constitué par un derme préalablement désépidermisé

Quelque soit le support choisi, le protocole pour sa mise en œuvre utilisé selon l'invention peut-être l'un quelconque des protocoles décrits dans l'art antérieur

Préférentiellement, selon l'invention lorsque le support est constitué par un derme préalablement désépidermisé on met en œuvre le protocole décrit dans Prunieras et collaborateurs, Ann Chir Plast. 1979, 24, n°4 357-362

Selon l'invention, pour obtenir l'équivalent d'épiderme comprenant au moins des kératinocytes et au moins des précurseurs de cellules de Langerhans induits ou non, on co-cultive ensemble sur le support au moins des kératinocytes et au moins des précurseurs de cellules de Langerhans induits ou non

Les kératinocytes utilisés selon l'invention peuvent être préparés selon toute méthode connue de l'art antérieur. On peut citer à titre d'exemple la culture à partir d'épiderme dissocié provenant de prélèvement de peau normale ou pathologique ou la culture de kératinocytes issus de la gaine de follicules pileux normaux ou pathologiques

Préférentiellement, selon l'invention les kératinocytes utilisés sont préparés à partir d'épiderme dissocié provenant de prélèvement de peau normale ou pathologique, selon la méthode décrite dans Régnier et collaborateurs, Frontier of Matrix Biology, Vol 9, 4-35 (Karger, Basel 1981)

Les précurseurs de cellules de Langerhans peuvent être toute cellule souche apte à se différencier sous l'effet d'une induction en cellules de Langerhans, c'est à dire apte à se différencier en cellules CD1a positives. Avantageusement, ces précurseurs peuvent être des cellules hématopoïétiques CD34⁺ (Caux et collaborateurs, Nature, Vol 360, Nov 1992, 258)

Les précurseurs de cellules de Langerhans peuvent être purifiés à partir des tissus dans lesquels ils se trouvent naturellement, parmi lesquels on peut citer la moelle osseuse, le sang périphérique, le sang de cordon ombilical

Préférentiellement, on utilise selon le procédé de l'invention des précurseurs de cellules de Langerhans préparés à partir de sang périphérique ou de sang de cordon ombilical et encore plus préférentiellement des précurseurs préparés à partir de sang de cordon ombilical

Toute méthode de purification peut être utilisée à

cette fin. On peut citer par exemple celle décrite dans Caux et collaborateurs. *Nature* Vol. 360 Nov 1992 258

Selon l'invention l'induction de la différenciation des précurseurs de cellules de Langerhans peut être réalisée avant ou après leur mise en co-culture

Cette induction peut bien évidemment être réalisée par toute méthode connue. Parmi ces méthodes on peut citer, par exemple, la différenciation induite par les cytokines telles que le facteur de stimulation de colonies (Granulocyte/Macrophage - Colony Stimulating Factor ou GM-CSF), le facteur de nécrose tumorale (Tumor Necrosis Factor ou TNF- α), le facteur de cellules souches (Stem Cell Factor ou SCF), l'interleukine 3 ou encore l'interleukine 4 ou un mélange de celles-ci.

Mais la demanderesse a découvert que de manière tout à fait surprenante la différenciation des précurseurs de cellules de Langerhans peut être spontanément induite par la présence de keratinocytes ou encore par une culture de ces précurseurs dans un milieu dans lequel ont été préalablement cultivés des keratinocytes.

L'induction en présence de keratinocytes peut donc être réalisée soit par une culture simultanée de précurseurs de cellules de Langerhans et de keratinocytes, l'induction intervenant dans la culture, soit par co-culture des précurseurs de cellules de Langerhans et des keratinocytes sur un support, par exemple un derme désepidermisé, l'induction intervenant au sein de la co-culture.

Préférentiellement selon l'invention, l'induction de la différenciation des précurseurs de cellules de Langerhans est réalisée par la présence de keratinocytes et encore plus préférentiellement par co-culture des précurseurs de cellules de Langerhans et des keratinocytes sur un support.

Avantageusement l'induction de la différenciation des précurseurs de cellules de Langerhans peut s'effectuer par la combinaison d'au moins deux de ces méthodes comme par exemple la culture en présence de keratinocytes et en présence d'au moins une cytokine ou encore la culture en présence d'un mélange de cytokines, comme par exemple la combinaison du GM-CSF et du TNF- α .

La concentration en cytokines utilisée pour l'induction est bien évidemment fonction de la nature de la cytokine utilisée.

Les cytokines sont en générale présentes à des concentrations comprises entre 1 ng/ml et 400 ng/ml de préférence entre 2,5 ng/ml et 300 ng/ml. Ainsi, par exemple pour le GM-CSF la concentration peut être comprise entre 100 ng/ml et 400 ng/ml et de préférence entre 200 ng/ml et 300 ng/ml. Pour le TNF- α la concentration peut être comprise entre 1 ng/ml et 7,5 ng/ml et de préférence entre 2,5 ng/ml et 5 ng/ml.

Dans la mesure où un mélange de cytokines est utilisé, la proportion d'une cytokine par rapport à l'autre varie en fonction de la nature des cytokines utilisées. Par exemple dans le cas du mélange GM-CSF/TNF- α .

celle-ci est comprise entre les rapports pondéraux 400/1 et 13/1 et de préférence entre 120/1 et 40/1.

Il est possible pour la mise en co-culture d'enrichir la préparation de précurseurs induits en celles CD1a positives. Pour cela on isole dans les cultures de précurseurs induits les cellules CD1a positives.

Selon l'invention le rapport entre le nombre de keratinocytes et les précurseurs de cellules de Langerhans induits ou non co-cultivés sur le support est compris entre les rapport 95/5 et 25/75 en pourcentage du nombre de cellules total dans la co-culture et préférentiellement entre 75/25 et 35/65 et encore plus préférentiellement ce rapport est de 50/50.

Selon le procédé de l'invention, les précurseurs des cellules de Langerhans induits ou non sont mis en co-culture à tout stade de l'élaboration de l'équivalent d'épiderme.

Avantageusement le procédé selon l'invention comporte une étape dans laquelle les précurseurs des cellules de Langerhans induits ou non sont mis en co-culture avec les keratinocytes en un temps qui permet leur localisation suprabasale dans l'équivalent d'épiderme.

Préférentiellement, les précurseurs des cellules de Langerhans induits ou non sont mis en co-culture à un temps choisi entre le moment où la couche suprabasale de l'équivalent d'épiderme commence à se former et le moment où les keratinocytes différenciés commencent à former la première couche du stratum corneum.

Encore plus préférentiellement, les précurseurs de cellules de Langerhans induits ou non sont mis en co-culture à un temps choisi entre le moment où la couche suprabasale de l'équivalent d'épiderme commence à se former et le deuxième jour d'incubation après exposition à l'interface air/liquide (voir ci-dessous).

Le milieu nutritif utilisé pour le procédé selon l'invention peut être tout milieu nutritif connu pour sa capacité à permettre la prolifération et la différenciation des keratinocytes. On peut citer à titre d'exemple le milieu Dulbecco modifié Eagle, ou un milieu défini à teneur en calcium variable, tel le milieu décrit par Boyce S.T. et Ham R.G. (*J Tissue Cult Meth* 1985, 9, 83-93).

Avantageusement, selon l'invention il est possible d'utiliser un mélange de plusieurs milieux nutritifs comme par exemple le mélange milieu Dulbecco modifié Eagle/ milieu HAM F12 ou milieu de Rheinwald et Green. (*Cell* 1975, 6, 331-334).

Selon le protocole de préparation de l'équivalent de peau, la co-culture est d'abord maintenue immergée dans un milieu nutritif pendant un temps d'incubation de 3 à 8 jours. Ce milieu nutritif peut être par exemple le milieu décrit par Rheinwald et Green, milieu qui permet la prolifération des keratinocytes.

Au bout de ce temps d'incubation la co-culture est portée à l'interface air/liquide, par exemple par dépôt sur une grille métallique. Le liquide est alors préférentiellement constitué du même milieu nutritif que le précédent, à la différence près que seuls 3 des facteurs de crois-

sances initialement contenues dans le milieu de Rheinwald et Green sont conservées aux mêmes concentrations, à savoir le facteur de croissance épidermique (EGF), l'insuline et l'hydrocortisone.

L'incubation se poursuit ensuite jusqu'à obtention d'un équivalent de peau présentant les caractéristiques d'une peau, à savoir un équivalent de derme supportant un équivalent d'épiderme présentant les couches cellulaires classiques à savoir les couches basale suprabasale granuleuse et cornée.

Ainsi l'incubation se poursuit pendant une durée comprise entre 5 et 30 jours.

Le modèle de peau reconstruite ainsi réalisée est constitué de deux entités, le support et l'équivalent d'épiderme qu'il est possible de séparer physiquement l'un de l'autre.

L'équivalent d'épiderme peut alors être utilisé séparément du support.

L'invention concerne donc également un équivalent d'épiderme caractérisé par le fait qu'il comprend au moins des kératinocytes et au moins des précurseurs de cellules de Langerhans induits ou non et son procédé de préparation tel que décrit ci-dessus.

Préférentiellement, l'équivalent d'épiderme selon l'invention présente au moins des précurseurs de cellules de Langerhans induits ou non localisées dans sa partie suprabasale.

Bien entendu l'équivalent de peau qui présente la meilleure similitude avec la peau normale est l'équivalent de peau qui contient les trois types cellulaires essentiels présents dans la peau normale.

Ainsi avantageusement, le modèle de peau reconstruite selon l'invention comprend en outre des mélanocytes.

L'invention concerne avantageusement un équivalent d'épiderme contenant des kératinocytes, au moins des précurseurs de cellules de Langerhans induits ou non et des mélanocytes.

Les mélanocytes utilisés selon l'invention peuvent être purifiés à partir de tout organe en contenant comme par exemple la peau normale ou le follicule de cheveu.

Préférentiellement, on utilise des mélanocytes purifiés à partir de peau normale.

Toute méthode de purification connue de l'art antérieur peut être utilisée pour préparer ces mélanocytes. On peut citer par exemple la méthode décrite dans Olsson et collaborateurs, *Acta Derm Venereol.* 1994, 74, 226-268.

Pour obtenir un équivalent de peau contenant les trois types cellulaires présents dans la peau normale, il est nécessaire de co-cultiver des kératinocytes, des précurseurs de cellules de Langerhans induits ou non et des mélanocytes sur un support.

Ainsi selon un autre mode particulier du procédé de l'invention, celui-ci se caractérise par le fait que l'on co-cultive sur un support des kératinocytes au moins des précurseurs de cellules de Langerhans induits ou

non et des mélanocytes.

Dans les cas d'un équivalent de peau comprenant les trois types cellulaires, le procédé mis en œuvre pour sa réalisation ne diffère en rien de celui exposé précédemment pour la réalisation d'un équivalent de peau comprenant deux types cellulaires.

Par exemple le rapport entre le mélange (kératinocytes+mélanocytes) et les cellules de Langerhans et/ou les précurseurs co-cultivés sur le support est compris entre les rapport 95/5 et 25/75 en pourcentage du nombre total de cellules dans la co-culture et préférentiellement entre 75/25 et 35/65 et encore plus préférentiellement ce rapport est de 50/50.

Le rapport particulier entre kératinocytes et mélanocytes peut être celui décrit dans l'art antérieur (WO-A-9351165).

Les exemples ci-dessous illustrent l'invention sans la limiter aucunement.

20 Exemple de préparation d'un équivalent d'épiderme contenant des kératinocytes, des cellules de Langerhans et des mélanocytes

On constitue un mélange de kératinocytes humains normaux préalablement isolés selon la méthode décrite dans Régnier et collaborateurs, *(Frontier of Matrix Biology Vol. 9, 4-35, Karger, Basel 1981)* et de mélanocytes humains préalablement isolés selon la méthode décrite dans Olsson et coll., *(Acta Derm Venereol. 1994, 74, 226-268)*, dans une proportion de 10 pour 1. Ce mélange est déposé sur un derme désépidermis à raison de 5×10^5 cellules par cm^2 , selon la méthode décrite dans Prunieras et collaborateurs, *Ann. Chir. Plast.* 1979, 24, n°4, 357-362. La culture s'effectue dans un milieu constitué d'un mélange de milieu Dulbecco modifié Eagle et de milieu HAM F12 en une proportion de 3 pour 1, contenant 10 % de serum de veau foetal, 10 ng/ml de facteur de croissance épidermique (EGF), 400 ng/ml d'hydrocortisone, 10^{-6} M isoproterénol 5 $\mu\text{g/ml}$ de transferrine, 2×10^{-9} M de triiodothyronine, 1.3×10^{-4} M d'adénine et 5 $\mu\text{g/ml}$ d'insuline (Rheinwald et Green, *Cell.* 1975, 6, 331-334). La culture est ainsi maintenue immergée pendant 6 jours. La culture est alors placée à l'interface air/liquide, l'édit liquide étant alors constitué du même milieu que précédemment duquel l'isoproterénol, la transferrine, la triiodothyronine et l'adénine ont été retirés.

Parallèlement, des cellules CD34+ sont isolées à partir de sang de cordon ombilical et cultivées selon la méthode décrite dans Caux et Coll., *(Nature. Vol. 360, 19 novembre 1992, pp. 258-260)*, pendant 6 jours en présence de facteur de stimulation de colonies (Granulocyte/Macrophage - Colony Stimulating Factor ou GM-CSF) à la concentration de 200 ng/ml et de facteur de nécrose tumorale (Tumor Necrosis Factor ou TNF- α) à la concentration de 2.5 ng/ml.

2 jours après passage du mélange kératinocytes/mélanocytes à l'interface air/liquide, on dépose sur l'épider-

me en reconstruction 5×10^5 cellules CD34+ telles que préalablement préparées. La culture est ensuite entretenue jusqu'à obtention d'un équivalent d'épiderme histologiquement satisfaisant; c'est à dire un équivalent d'épiderme présentant les couches cellulaires classiques à savoir les couches basale, suprabasale, granuleuse et corneé.

Préparation d'un équivalent d'épiderme contenant des keratinocytes et des cellules de Langerhans sans préinduction des précurseurs de cellules de Langerhans

On constitue un mélange de keratinocytes humains normaux préalablement isolés selon la méthode décrite dans Regnier et coll. (Frontier of Matrix Biology, Vol 9, 4-35 Karger Basel 1981) et de cellules CD34+ isolées à partir de sang de cordon ombilical selon la méthode décrite dans Caux et Coll. (Nature, Vol 360, 19 novembre 1992, pp. 258-260) dans une proportion de 1 pour 1. Ce mélange est déposé sur un derme désépidermisé à raison de 5×10^5 cellules de chaque type par cm^2 , selon la méthode décrite dans Prunieras et coll. (Ann Chir Plast. 1979, 24, n°4, 357-362). La co-culture s'effectue dans un milieu constitué d'un mélange de milieu Dulbecco modifié Eagle et de milieu HAM F12 en un rapport volumique de 3 pour 1, contenant 10 % de sérum de veau foetal, 10 ng/ml de facteur de croissance épidermique (EGF), 400 ng/ml d'hydrocortisone, 10^{-6} M l'isoprotérol, 5 µg/ml de transferrine, 2×10^{-9} M de triiodothyronine, 1.8×10^{-4} M d'adénine et 5 µg/ml d'insuline (Rheinwald et Green, Cell, 1975, 6, 331-334). La culture est ainsi maintenue immergée pendant 6 jours. La culture est alors placée à l'interface air/liquide, ledit liquide étant alors constitué du même milieu que précédemment duquel l'isoprotérol, la transferrine, la triiodothyronine et l'adénine ont été retirés.

La co-culture est ensuite entretenue jusqu'à obtention d'un équivalent d'épiderme histologiquement satisfaisant, c'est à dire un équivalent d'épiderme présentant les couches cellulaires classiques, à savoir les couches basale, suprabasale, granuleuse et corneé.

Revendications

- Equivalent de peau, caractérisé par le fait qu'il comprend un équivalent d'épiderme sur un support, ledit équivalent d'épiderme comprenant au moins des keratinocytes et au moins des précurseurs de cellules de Langerhans induits ou non.
- Equivalent de peau selon la revendication 1, caractérisé par le fait que le support est choisi parmi les lattices mixtes collagène/fibroblastes, le derme préalablement désépidermisé, les membranes artificielles comme par exemple les filtres de marque Millipores, les substituts sous-cutanés à base de

collagène, le plastique ou tout autre support compatible avec la viabilité cellulaire.

- Equivalent de peau selon la revendication 2, caractérisé par le fait que le support est constitué par du derme préalablement désépidermisé.
- Equivalent de peau selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé par le fait qu'il comprend en outre des melanocytes.
- Equivalent de peau selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé par le fait que les précurseurs de cellules de Langerhans induits ou non ont une localisation suprabasale dans l'équivalent d'épiderme.
- Procédé de préparation d'un équivalent de peau caractérisé par le fait que l'on co-cultive sur un support des keratinocytes et au moins des précurseurs de cellules de Langerhans induits ou non.
- Procédé selon la revendication 6, caractérisé par le fait que le rapport entre le nombre de keratinocytes et les précurseurs de cellules de Langerhans induits ou non, co-cultivés sur le support est compris entre les rapport 95/5 et 25/75 en pourcentage du nombre total de cellules dans la co-culture et préférentiellement entre 75/25 et 35/65 et encore plus préférentiellement ce rapport est de 50/50.
- Procédé selon l'une quelconque des revendications 6 ou 7, caractérisé par le fait que les keratinocytes sont obtenus par la culture à partir d'épiderme dissocié provenant de prélèvement de peau normale ou pathologique ou par la culture de keratinocytes issus de la gaine de follicule pileux normaux ou pathologiques.
- Procédé selon la revendication précédente, caractérisé par le fait que les keratinocytes sont obtenus à partir de prélèvement de peau normale ou pathologique.
- Procédé selon l'une quelconque des revendications 6 à 9, caractérisé par le fait que les précurseurs des cellules de Langerhans sont purifiés à partir de moelle osseuse, de sang périphérique ou de sang de cordon ombilical.
- Procédé selon la revendication précédente, caractérisé par le fait que les précurseurs des cellules de Langerhans sont purifiés à partir de sang de cordon ombilical.
- Procédé selon l'une quelconque des revendications 6 à 11, caractérisé par le fait que les précurseurs de cellules de Langerhans sont des cellules hema-

topoïétiques CD34⁺

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 6 à 12 caractérisé par le fait que la différenciation des précurseurs de cellules de Langerhans est induite avant ou après leur mise en co-culture

14. Procédé selon la revendication précédente caractérisé par le fait que la différenciation des précurseurs de cellules de Langerhans est induite après leur mise en co-culture

15. Procédé selon l'une quelconque des revendications 13 ou 14 caractérisé par le fait que la différenciation des précurseurs de cellules de Langerhans est induite selon une méthode choisie parmi la culture en présence de keratinocytes, la culture dans un milieu dans lequel ont été préalablement cultivés des keratinocytes, la culture en présence d'une cytokine choisie parmi le facteur de stimulation de colonies, le facteur de nécrose tumorale, le facteur de cellules souches l'interleukine 3 ou l'interleukine 4

16. Procédé selon la revendication précédente caractérisé par le fait que la différenciation est induite par la combinaison d'au moins deux des méthodes choisies parmi la culture en présence de keratinocytes, la culture dans un milieu dans lequel ont été préalablement cultivés des keratinocytes, la culture en présence d'une cytokine choisie parmi le facteur de stimulation de colonies, le facteur de nécrose tumorale, le facteur de cellules souches l'interleukine 3 ou l'interleukine 4

17. Procédé selon la revendication 16, caractérisé par le fait que la différenciation est induite par la culture en présence de keratinocytes et en présence d'au moins une cytokine ou par la culture en présence d'un mélange de cytokines, comme par exemple la combinaison du GM-CSF et du TNF- α

18. Procédé selon la revendication précédente caractérisé par le fait que la différenciation est induite par un mélange de GM-CSF et du TNF- α

19. Procédé selon l'une quelconque des revendications 6 à 18, caractérisé par le fait que les cytokines sont présentes à des concentrations comprises entre 1 ng/ml et 400 ng/ml de préférence entre 2,5 ng/ml et 300 ng/ml

20. Procédé selon l'une quelconque des revendications 6 à 19 caractérisé par le fait que la concentration en GM-CSF est comprise entre 100 ng/ml et 400 ng/ml et de préférence entre 200 ng/ml et 300 ng/ml

21. Procédé selon l'une quelconque des revendications 6 à 20 caractérisé par le fait que la concentration en TNF- α est comprise entre 1 ng/ml et 7,5 ng/ml et de préférence entre 2,5 ng/ml et 5 ng/ml

5 22. Procédé selon la revendication 18 caractérisé par le fait que la proportion entre cytokines dans le cas du mélange GM-CSF/TNF- α est comprise entre les rapports pondéraux 400:1 et 13:1 et de préférence entre 120:1 et 40:1

10 23. Procédé selon l'une quelconque des revendications 6 à 22 caractérisé par le fait que les précurseurs des cellules de Langerhans induits ou non sont mis en co-culture avec les keratinocytes en un temps permettant leur localisation dans la partie suprabasale de l'équivalent d'épiderme

15 24. Procédé selon la revendication précédente caractérisé par le fait que les précurseurs des cellules de Langerhans induits ou non sont mis en culture à un temps choisi entre le moment où la couche suprabasale de l'équivalent d'épiderme commence à se former et le moment où les keratinocytes différencies commencent à former la première couche du stratum corneum

20 25. Procédé selon la revendication 24 caractérisé par le fait que les précurseurs des cellules de Langerhans induits ou non sont mis en co-culture à un temps choisi entre le moment où la couche suprabasale de l'équivalent d'épiderme commence à se former et le deuxième jour de culture après passage à l'interface air/liquide

25 30 26. Procédé selon l'une quelconque des revendications 6 à 25, caractérisé par le fait que l'on co-cultive en outre des melanocytes

35 40 27. Équivalent d'épiderme, caractérisé par le fait qu'il comprend au moins des keratinocytes et des précurseurs des cellules de Langerhans induits ou non

45 28. Équivalent d'épiderme selon la revendication 27, caractérisé par le fait qu'il comprend en outre des melanocytes

50 29. Équivalent d'épiderme selon l'une quelconque des revendications 27 ou 28, caractérisé par le fait que les précurseurs des cellules de Langerhans induits ou non ont une localisation suprabasale

55



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Nombre de la demande

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

CATEGORIE	CITATION DU DOCUMENT AVEC INDICATION, EN CAS DE BESOIN, DES PARTIES PERTINENTES	REVENDICATION CONCERNEE	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (CAT.CLE)
Y	EP 0 470 681 A (GRACE W R & CO) 12 Février 1992 * colonne 4, ligne 23 - colonne 8, ligne 37 *	1-29	C12N5/06 A61L27/00
Y,D	WO 90 02796 A (MARROW TECH INC) 22 Mars 1990 * page 11, ligne 15 - page 27, ligne 16 * * page 50, ligne 1 - page 59, ligne 34 * -----	1-29	-----

Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications

nom de la recherche	Date d'achèvement de la recherche	examinateur
LA HAYE	26 Mai 1997	Rempp, G
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		
X : particulièrement pertinent à la seul	T : thème ou principe à la base de l'invention	
Y : particulièrement pertinent en complément avec un autre document de la même catégorie	B : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date	
A : arrêté-plan technique	D : cité dans la demande	
O : divulgation non-entrée	L : cité pour d'autres raisons	
P : document intercalaire	R : membre de la même famille, document correspondant	